



TITLE:

計画:10-3 機械刺激に対するサル血管内皮細胞の反応(Ⅱ 共同利用研究 2.研究成果)

AUTHOR(S):

成瀬, 恵治

CITATION:

成瀬, 恵治. 計画:10-3 機械刺激に対するサル血管内皮細胞の反応(Ⅱ 共同利用研究 2.研究成果). 霊長類研究所年報 1993, 23: 70-71

ISSUE DATE:

1993-09-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/164462>

RIGHT:

胞を水晶体内部に蓄積するが、その接着に糖脂質の糖鎖が重要な役割を持っていることが明らかになりつつある。近年、血球細胞と血管内皮細胞との接着ではシアリル Lewis^x (NeuAc α 2-3Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc) ハプテンとレクチン構造を持つセレクトインと呼ばれる蛋白質との特異的な結合によることが明らかにされた。ヒトやサルの水晶体の糖脂質にもシアリル Lewis^x ハプテンが存在し、その脱シアリル酸された Lewis^x ハプテンがヒトでは加齢と白内障の進行程度に依存して増加する。

Lewis^x ハプテンはマウス初期胚での割球間における細胞接着に関与することが報告されている。そこで霊長類での水晶体線維細胞間の接着や白内障発症に果たす役割を解明するためにアカゲザルとニホンザルの水晶体上皮細胞の培養系を用いて糖脂質の生理的意義を検討した。しかし、培養上皮細胞ではシアリル Lewis^x と Lewis^x ハプテンのいずれも発現されず、また水晶体上皮にも発現されていない。これらの知見はシアリル Lewis^x や Lewis^x ハプテンの発現が上皮細胞の線維細胞への分化と強く関連している可能性を示唆している。

上皮細胞の培養系では未継代での長期間培養が線維細胞への分化を促すことが知られている。ここでは細胞の重層化が生じ、 γ クリスタリンの発現とともに脱核と透明化が起こる。この過程に糖脂質による細胞間接着がなならぬの役割をもつことが予想され、現在実験を行なっている。また、糖脂質や成長因子などの添加が上皮細胞から線維細胞への分化を誘起できるかもしれない。血管系で知られるセレクトインの存在は現在までのところ水晶体の蛋白質レベルでは検出されず、他の接着様式による可能性も予想される。

計画：10-2

サル腎臓に特異的なジヒドロジオール脱水素酵素の構造と機能

原 明・中山俊裕・出屋敷嘉宏
(岐阜薬大)

発癌性多環状芳香族炭化水素の解毒酵素であるジヒドロジオール脱水素酵素は哺乳動物組織に広く分布するが、種または組織によって性状が異なる。本研究はサル腎臓に特異的に高濃度存在する2量体ジヒドロジオール脱水素酵素の構造、機能

および臓器特異的な発現機構を明らかにすることを目的として、今年度は、サル腎の酵素と類似の性質のブタ肝の酵素の活性部位と特異的阻害剤の結合部位のアミノ酸残基について比較検討し、またその部分アミノ酸配列を調べた。

ブタ肝およびサル腎の両酵素はジェチルピロカルボネイト処理およびローズベンガルを用いた光酸化により失活した。失活の速度論的解析および修飾ヒスチジン残基の分光学的分析からサブユニット当り1残基のヒスチジンが修飾されることが示唆された。本酵素反応は補酵素 NADP が結合後基質ジヒドロジオールが結合する ordered 機構に従い、その酵素・NADP 複合体に特異的に結合する括抗阻害剤としてアスコルビン酸を見い出している。アスコルビン酸は NADP 共存下でのみこのヒスチジン修飾による失活を保護したので必須ヒスチジン残基は本酵素の基質結合部位に存在し、塩基触媒として働くと考えられた。このように、ブタとサルの両酵素は反応機構および活性部位アミノ酸残基においても極めて類似していることが示された。

また、2量体ジヒドロジオール脱水素酵素の特異的で強い阻害剤として4-ヒドロキシフェニルケトン化合物を見い出した。阻害の速度論的解析および必須ヒスチジン残基の化学修飾に対する影響の分析の結果、その阻害機構と結合部位はアスコルビン酸の場合と同一であった。これらの化合物の構造と阻害活性の比較により、基質または阻害剤に要求される構造的要素が明確になった。

サル腎の酵素のアミノ末端はブロックされていたが、そのブロムシアン分解、トリプシンやリシルエンドペプチダーゼ消化ペプチドを分離精製し、本酵素のいくつかの内部アミノ酸配列を明らかにした。次年度に予定している本酵素 cDNA のクローニングと一次構造決定のため、これらの配列に基づく DNA プローブを合成した。

計画：10-3

機械刺激に対するサル血管内皮細胞の反応

成瀬恵治
(名古屋大・医)

本年度はサル血管内皮細胞を分離し培養系に持ち込むことを主目的とした。分離・培養することにより実験系を単純にし、またパッチクランプ法

による機械受容チャネルの解析, またカルシウム蛍光色素を用いた機械刺激にともなう細胞内カルシウム動態を測定することができるという利点がある。

方法: 実験殺によるサルから胸部大動脈を摘出し, 滅菌生理食塩水に入れ充分に冷やす。洗浄後, クリーンベンチ内で血管軸方向に切開し血管内側に位置する内皮細胞をメス刃により剥離した。遠心分離後, ディッシュに播き培養した。培養条件を決定するために2種類の培地にて細胞増殖曲線を求めた。培地として, イーグル MEM にウシ胎児血清を20%添加したもの(ET 培地)と市販のヒト内皮細胞培地 ET-UV (三光純薬)を用いた。機械刺激法はシリコン膜上に細胞を培養し Fura 2 を用いたカルシウム蛍光顕微鏡にて測定した。結果: 分離培養後, 3・5・7・9・12日後の細胞の数をカウントしたところ ET 培地中では細胞は殆ど増殖せずむしろ減少した。一方, ET-UV 培地中では細胞の増殖は著しく7日ではほぼコンフルエントになり初期細胞数の約10倍になった。

機械刺激による細胞内カルシウム動態の解析は現在進行中である。

考察: この結果はヒトサイ帯静脈より得られた血管内皮細胞でのデータと一致する。この培養条件でサル大動脈内皮細胞を分離・継代することができた。

計画: 11-1

ニホンザルの花粉アレルギーに関する研究

—肥満細胞を中心にして—

永井博式・稲垣直樹(岐阜薬大・薬理)

ニホンザルにおける花粉症の発症機序を知る目的でアレルギー性メディエーター, 特にニューロペプチドの意義について検討を行った。すなわち, アレルギー性鼻炎の症状のうち, 鼻汁分泌亢進, くしゃみ発作および鼻閉のいずれにも肥満細胞由来のケミカルメディエーターの関与が考えられる。これまでの研究ではサブタンクス P (SP) の *in vivo* での適用により下鼻甲粘膜炎の腫張がみられたにもかかわらず, *in vitro* での摘出鼻粘膜標本からは SP によりヒスタミンの遊離はみられなかった。そこで, ニホンザル摘出鼻粘膜標本に SP を作用させた際に遊離するロイコトリエンなど他のメディエーターについての検討を行った。

SP によりロイコトリエン C₄ はごく微量遊離されたが, 他のメディエーターは検出されなかった。したがって, *in vivo* での粘膜浮腫は axon reflex により惹起されたものと思われた。

今後は, 鼻粘膜での神経支配あるいは単離肥満細胞の培養により, 肥満細胞の性質の確立を検討したいと考えている。

計画: 11-2

ニホンザルの花粉アレルギーに関する研究

藤本浩二(社団法人・予防衛生協会)

ヒトの各種即時型アレルギー疾患においては, IgE に対する第2の受容体である FcεRII (CD23) のB細胞やマクロファージ上での発現増加, あるいは血清中の可溶性 FcεRII (sFcεRII) レベルの上昇が調べられており, アレルギーの活動状態と FcεRII との関係が注目されている。本研究では, サル類の FcεRII 検出に当たっての基礎的検討を行った。

1. サル血清中の sFcεRII を2種類の抗ヒト FcεRII モノクローナル抗体を組み合わせ ELISA 法で測定した。測定結果はヒトが340U/ml, チンパンジー56U/ml, オランウータン124U/ml, アジルテナガザル20U/mlであった。同時に調べた旧世界サル6種, 新世界サル5種, 原猿4種では検出不能であり, 使用したモノクローナル抗体がこれらの小型サル種とは反応しないことが考えられた。

2. サルト異 EB ウイルスでトランスフォームしたカニクイサルB細胞株上での FcεRII (CD23) の発現を抗ヒト CD23モノクローナル (H107: ニチレイ) を利用して FACS で調べた。カニクイサルB細胞株にヒト由来 B-cell Growth Factor (BCGF) を加え, 48時間培養した場合最も強い CD23の発現が認められた。

今後は CD23陽性カニクイサルB細胞株を利用して, サル類の CD23に特異的に反応するモノクローナル抗体を複数作成する必要がある。

なお, 旧世界サル IgE の測定については抗ヒト IgE ポリクローナル抗体を利用したサンドイッチ ELISA で定量系が確立でき, 標準化を進めている。